

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28	A1	(11) 国際公開番号 WO99/46378 (43) 国際公開日 1999年9月16日(16.09.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01191 (22) 国際出願日 1999年3月11日(11.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/60245 1998年3月12日(12.03.98) JP 特願平11/26774 1999年2月3日(03.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松本光之(MATSUMOTO, Mitsuyuki)[JP/JP] 杉本 貫(SUGIMOTO, Toru)[JP/JP] 高崎 淳(TAKASAKI, Jun)[JP/JP] 蒲原正純(KAMOHARA, Masazumi)[JP/JP] 斉藤 哲(SAITO, Tetsu)[JP/JP] 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki, (JP)		小林正人(KOBAYASHI, Masato)[JP/JP] 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 長井省三, 外(NAGAI, Shozo et al.) 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS (54) 発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (57) Abstract Regarding the field of genetic engineering, novel G protein-coupled receptor family proteins SREB1, SREB2 and SREB3 expressed in the central nervous system; genes encoding these proteins; and a screening method, etc., with the use of these proteins. An example of methods for acquiring such a G protein-coupled receptor protein as described above comprises effecting RT-PCR with the use of mRNA extracted from a human or rat brain tissue or cells originating in the brain as a template by employing two primers between which the whole translational region of the G protein-coupled receptor protein or a part thereof is sandwiched to thereby obtain cDNA of the G protein-coupled receptor protein or a part thereof and then integrating the cDNA into an appropriate vector followed by the expression thereof in host cells.		

(57)要約

本発明は遺伝子工学の分野に属し、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質SREB1、SREB2およびSREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、並びに、該蛋白質を用いたスクリーニング法等を提供する。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の取得方法の一つとして、ヒトまたはラット脳組織あるいは脳由来細胞から抽出されたmRNAを鋳型として、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質翻訳領域の全体または一部をはさむ2種類のプライマーを用い、RT-PCRを行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一部を得、該cDNAを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞で発現させる方法が挙げられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボワール	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク						

明 細 書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いたスクリーニング法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体、該抗体を用いたスクリーニング法に関するものである。

背景技術

三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は「G蛋白質共役型レセプター」と総称されている。現在まで知られている全てのG蛋白質共役型レセプターはアミノ末端を細胞外、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。G蛋白質共役型レセプターは様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスホオリパーゼ C を介する Ca^{++} などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた(Gudermann, T. et al. (1997) Annu. Rev. Neurosci., 20, 399-427)。G蛋白質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、~~ア~~モカイン、脂質由来の情報伝達物質、2 価イオ

ン、プロテアーゼなど既存の生理活性物質の多くが含まれる。これら生理活性物質にはそれぞれ特異的なG蛋白質共役型レセプターが存在し、その情報を細胞内に伝達する。

現在までに数百種類のG蛋白質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたG蛋白質共役型レセプターがクローニングされており、これらが疾患に対する薬剤の標的となっている。G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、泌尿器生殖器系それぞれの分野でG蛋白質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。このことはG蛋白質共役型レセプターのアゴニスト或いはアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、そのため新たなG蛋白質共役型レセプターの発見、同定のための研究が盛んに行われている。

G蛋白質共役型レセプターはそのスーパーファミリー内での構造類似性から遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターはオーファンG蛋白質共役型レセプターと呼ばれている。一般的にオーファンG蛋白質共役型レセプターは特異的なリガンドが発見されていないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングを組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている(Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18, 430-437)。

すなわち、多くのG蛋白質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっているcAMP、 Ca^{2+} の測定、或いは、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化の指標となる GTPase 活性、GTP γ S のG蛋白質結合測定をハイスループット化することで化合物ライブラリーからオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患

の治療ターゲットとなり得る新規G蛋白質共役型レセプターの発見が、G蛋白質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

G蛋白質共役型レセプターでは、一つの内在性リガンドに対して複数のレセプターが存在する場合がある。このようなレセプター群はレセプターファミリーとよばれ、各々のレセプターはサブタイプと称される。全てのG蛋白質共役型レセプターは細胞膜を7回貫通する構造を共有するため、互いに独立したG蛋白質共役型レセプターでも膜貫通領域を中心に20-25%のアミノ酸が保存されているが、レセプターファミリーを形成している場合にはそのサブタイプ間で保存されているアミノ酸の割合が35%以上、特に関連が高いサブタイプ間では60-80%と有意に上昇する(Strader, C.D. et al. (1994) Annu. Rev. Biochem., 63, 101-132)。

レセプターファミリーが存在する内在性リガンドをターゲットとした疾患治療薬の開発を考える際には、サブタイプの特異性が重要となる場合が多い。通常、薬剤の主作用を介するサブタイプへの作用に対して、他のサブタイプへの作用は副作用につながることも多いためである。このためサブタイプ特異的なアゴニスト、或いはアンタゴニストの創製が望まれるが、そのためにはサブタイプの特異性を検出する手段が必要である。現在ではサブタイプの遺伝子をクローニングし、それを発現させた培養細胞系などを用いて特異性を検出する系を構築するという方法が一般的である。

新規なG蛋白質共役型レセプターを疾患治療のターゲットとする場合にもサブタイプ特異性が重要である可能性は高く、このため新規G蛋白質共役型レセプターにおいてもレセプターファミリーの発見は重要である。独立したG蛋白質共役型レセプター間ではアミノ酸配列のホモロジーは全体で20-25%であるが、レセプターファミリーを形成している場合、ファミリー内では通常ホモロジーが有意に上昇することから、二者のG蛋白質共役型レセプターのホモロジーを比較することで、それらがファミリーを形成しているかどうか推定することが可能である。これを利用することでファミリーを形成している新規G蛋白質共役型レセプターの発見も可能であり、新規G蛋白質共役型レセプターファミリーが発見された場

合は、サブタイプ特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの創製が可能なことから疾患治療薬への道が更に拓けるものと考えられる。

中枢神経系は神経伝達物質に代表される生理活性物質を用いて様々な情報を伝達、制御している。その情報伝達および制御にG蛋白質共役型レセプターが重要な役割を果たしている。多くの種類のG蛋白質共役型レセプターが中枢神経系に存在しているため、それらは中枢神経系の疾患の重要な治療ターゲットとなっている。例えば、神経伝達物質ドーパミンのG蛋白質共役型レセプターは精神分裂病 (Seeman, P. et al. (1997) *Neuropsychopharmacology*, 16, 93-110)、セロトニンのG蛋白質共役型レセプターは鬱病 (Cowen, P. J. (1991) *Br. J. Psychiatry*, 159 (Suppl. 12), 7-14)、ニューロペプチド Y のG蛋白質共役型レセプターは摂食障害 (Blomqvist, A. G. and Herzog, H. (1997) *Trends Neurosci.*, 20, 294-298) の治療ターゲットであると考えられている。

中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプター、好ましくはヒト由来のレセプターは新たな中枢神経系の疾患の治療ターゲットの候補または中枢神経系の機能解明に繋がると考えられる。また、サブタイプ特異的な薬剤を開発するためには中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプターにおいてもファミリーを発見することが望ましい。本発明G蛋白質共役型レセプターの一つ SREB1 のアミノ酸配列に対してホモロジーが高いマウスから得られたレセプター GPR27 の遺伝子と、その遺伝子配列に基づくアミノ酸配列が報告されている (O' Dowd, B.F. et al. (1998) *Genomics*, 47, 310-313) が、ヒト由来のレセプターの遺伝子配列、アミノ酸配列は現時点では知られていない。

発明の開示

本発明は、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質を中枢性疾患の治療薬剤の標的として提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーをコードする遺伝子(SREB1、SREB2、SREB3、rSREB1、rSREB2、rSREB3)を単離することに成功した。

また、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法を確立、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質及び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニングを可能とした。

具体的には本発明は、

(1) 配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

好ましくは配列番号:2、4または6記載のアミノ酸配列を有しているヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは6、22または26記載のアミノ酸配列を有しているラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質であり、

(2) 配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

(3) 前記(1)に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子、

(4) 前記(3)記載の遺伝子を含むベクター、

(5) 前記(4)記載のベクターを含む宿主細胞、

(6) 前記(5)記載の宿主細胞を用いる前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、

(7) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法、または

(8) 前記(1)または(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

以下、本発明で使用する用語につき説明する。

「ヒト由来」または「ラット由来」とは、ヒトまたはラットで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列であることをいう。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の「同効物」とは、配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質のいずれかと同一の活性を示す、中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質をいう。

なお、G蛋白質共役型レセプターとG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同義である。

本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物なら何れでもよい。具体的には配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列、あるいは、配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個、好ましくは1乃至10個、更に好ましくは1乃至7個、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示される蛋白質と同一の活性を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であれば本発明に包含される。好ましくは、ヒト由来又はラット由来の配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質である。

また、本発明の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子は、配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子なら何れ

でもよい。好ましくは、配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号:1記載の塩基配列の1番目から1125番目、配列番号:3記載の塩基配列の1番目から1110番目、配列番号:5記載の塩基配列の1番目から1119番目、配列番号:21記載の塩基配列の1番目から1131番目、配列番号:23記載の塩基配列の1番目から1110番目、又は配列番号:25記載の1番目から1119番目を有する遺伝子である。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子は、以下の方法によって得ることができる。

1)新規G蛋白質共役型レセプター遺伝子の製造方法

a)第1製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、SREB1、SREB2、または SREB3 のそれぞれに適した逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(以下 RT-PCR という)を行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られたG蛋白質共役型レセプターcDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該レセプター蛋白質を製造することができる。

まず、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳またはラット脳から該蛋白質をコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザン ブロットリング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタン ブロットリング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出済 mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規G蛋白質共役型レセプターDNA を増幅する。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖 cDNA を合成した後、この1本鎖 cDNA から2本鎖 cDNA を合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land 法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo 法(Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg 法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5 α 株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557-580)、すなわち CaCl_2 や MgCl_2 または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(^{32}P 又は ^{33}P で標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③ 他の動物細胞で新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし(この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用

いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA を有する株を選択する。

④ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にブロットし本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al.(1982):" Molecular Cloning-A Laboratory Manual "Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

配列番号: 2、4、6、22、または26で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質機能を発現するためには、必ずしも配列表 配列番号:2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く、例えばその一部の配列であっても、あるいは他のアミノ酸配列が付加されていても、それが配列番号:2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質と同一の活性を示す限り、それらの蛋白質もまた本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に包含される。また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ(例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159 を参照)、この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。したがって、配列番号:2、4、または6で示されるアミノ酸配列の中の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、失欠、または挿入されている蛋白質でも配列番号:2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプターと同一の活性を有していることがありえる。これらの蛋白質は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物と呼び、本発明に含まれる。また、配列番号:22、24、または26で示されるラット由来アミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター、または当該レセプターと同一の活性を有しているG蛋白質共役型レセプターも同効物に包含される。

これらの本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子はすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明の遺伝子は、上記本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al.(1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham, R. et al.(1981) Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific

mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。

以上、a)乃至d)により得られる DNA の配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980): "Methods in Enzymology" 65, 499-559)や M13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J (1982) Gene, 19, 269-276)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のG蛋白質共役型レセプターの組み換え蛋白質の製造方法

単離された本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNA に再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である COS 細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4(Invitrogen 社)等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) *Med. Immunol.*, 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) *Nature*, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) *Virology*, 52, 456-457)、FuGENE6(Boehringer Mannheim 社)を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.*, 1, 841-845)等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) や pSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341)等をコトランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4(Invitrogen 社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル

最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、該レセプター蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えばレセプター蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等)でG蛋白質共役型レセプター蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もレセプターの特性を保持することができる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質はマーカ配列とインフレームで融合して発現させることで、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカ配列と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

本発明にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング法が包含される。該スクリーニング法は、前記により構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いて、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の生理学的な特性に応じたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の修飾の指標を測定する系に被験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は従来G蛋白質共役型レセプターリガンド活性を有することは知られているが該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のG蛋白質共役型レセプターリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

3) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質にリガンド、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体のスクリーニング方法

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合する化合物、ペプチド及び抗体(総称してリガンド)はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を調製し、リガンド結合アッセイ用に精製されたりガンドを放射性標識(50-2000 Ci/mmol)する。緩衝液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を放射性標識したリガンドと共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッフ

ァーで洗淨した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する(全結合量)。放射性標識していないリガンドを上記反応液中に大過剰加えることにより非特異的結合量を測定し、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量がえられる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品に対して特異的結合を示したリガンドを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。また、得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体、アンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

b) GTP γ S 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体はGTP γ S 結合法によりスクリーニングすることが可能である(Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120-1127)。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜を 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTP γ S 400 pM と混合する。被検薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被検薬存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

c) 細胞内 Ca²⁺および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

多くのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はアゴニスト刺激で細胞内の Ca^{++} の上昇および／または cAMP 濃度の上昇または低下を引き起こす。ゆえに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体は細胞内 Ca^{++} または cAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。 Ca^{++} 濃度の測定は fura2 等を用い、cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット(Amersham 社等)を用いて測定する。

また、 Ca^{++} および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより間接的に Ca^{++} および cAMP 濃度を測定することが可能である。該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、 Ca^{++} および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca^{++} の上昇および／または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による Ca^{++} の上昇および／または cAMP 濃度の上昇または低下を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

d) マイクロフィジオメーターを用いたスクリーニング方法

細胞が様々なシグナル応答を行う場合、細胞外への微少な水素イオンの流出が検出される。この水素イオンの流出は、その大部分が、細胞が応答するためのエネルギーを得るための燃料消費で生ずる代謝産物の増加、または細胞のシグナルが直接水素イオンポンプに伝達する場合に生ずる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、そのシグナル伝達にエネルギーを必要とするため、レセプターの活性化の際には水素イオンの流出が起こる。CYTOSENSOR マイクロフィジオメーター(Molecular Devices 社)により、こ

のような細胞近傍の培地中の微少な水素イオンの流出による pH 変化が検出可能であることから、このようなエネルギーを消費する受容体の活性化の検出に利用できる。

該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞（コントロール細胞）に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、水素イオンの流出による pH 変化を測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な水素イオンの流出による pH 変化を指標にアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体による水素イオンの流出による pH 変化を指標に該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングすることができる。

本発明には、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質または前記スクリーニング法により選択された G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を有意に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬が包含される。

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質や該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵からポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法(Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497)により当業者が容易に製造することが可能である。

本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4 日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。

このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体ま

たはその一部分を含む抗体断片は該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法(Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179)により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス(Lonberg, N. et al. (1994) Nature, 368, 856-859)に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

本発明医薬は、G蛋白質共役型レセプターの活性を選択的に制御する新規な薬理作用を有することを特徴としており、該医薬の用途としては該G蛋白質共役型レセプター活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患である中枢性疾患などが挙げられる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質活性修飾化合物、ペプチド、抗体または抗体断片を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあつては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグ

ネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

図面の簡単な説明

図1は、SREB1、SREB2、及び SREB3 のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

図2は、SREB1 のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図3は、SREB1 のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図4は、SREB2 のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図5は、SREB2 のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図6は、SREB3 のヒト臓器についてのノーザン解析の結果を示す。

図7は、SREB3 のヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

図8は、SREB1、SREB2 または SREB3 蛋白質の発現を確認した結果を示す。

図9は、抗3LO抗体の SREB1、SREB2 または SREB3 に対する結合活性を示す。

図10は、抗C24抗体の SREB1 に対する結合活性を示す。

図11は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

図12は、SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞における pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従って実施可能である。

(実施例1)新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質をコードする遺伝子の単離

本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質(SREB1、SREB2 または SREB3)をコードする全長 cDNA は、ヒト脳由来の poly A⁺ RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

新規G蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA CGCGATGGCGAACGCGAGCGA-3'(配列番号: 7)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA GTCTATGTGGCGGGGCCTCCC-3'(配列番号: 8)を用いた(それぞれの5'末端には XbaI site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase(Stratagene 社)を用い 5% formamide 存在下で 98 °C(20 秒)/64 °C(30 秒)/74 °C(3 分)のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。pCEP4 plasmid

は、動物細胞において強力なプロモーター活性を示す CMV プロモーターを持っているので、動物細胞に組み換え蛋白質を発現させるのに使用できる。得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号: 1 に示す。

同配列は 1125 base の open reading frame (配列番号: 1 の第 1 番目から第 1125 番目) を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列 (375 アミノ酸) を配列表 配列番号: 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規 G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA TCTATGGCGAACTATAGCCATGCA-3' (配列番号: 9)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (配列番号: 10) を用いた (それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase (Stratagene 社) を用い 96°C (20 秒) / 54°C (30 秒) / 74°C (3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pCEP4 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号: 3 に示す。

同配列は 1110 base の open reading frame (配列番号: 3 の第 1 番目から第 1110 番目) を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列 (370 アミノ酸) を配列表 配列番号: 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規 G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA GTATGGCCAACACTACCGGAGAG-3' (配列番号: 11)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA CCTGTCTGCCTACCCAGCCTGC-3' (配列番号: 12) を用いた (そ

れぞれの 5'末端には XbaI site が付加してある)。RT-PCR は Pfu DNA polymerase (Stratagene 社)を用い 5% formamide 存在下で 98°C(20 秒)／62°C(30 秒)／74°C(3 分)のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pCEP4 plasmid(Invitrogen 社)を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号:5 に示す。

同配列は 1119 base の open reading frame(配列番号:5の第 1 番目から第 1119 番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表 配列番号:6 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規G蛋白質共役型レセプターSREB ファミリー(SREB1、SREB2 または SREB3)と既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーとのホモロジーはそれぞれアミノ酸配列で25%以下である。

一方、SREB1 と SREB2 のホモロジーは 52%、SREB1 と SREB3 のホモロジーは 52%、SREB2 と SREB3 のホモロジーは 63%と既存のG蛋白質共役型レセプターとのホモロジーに比べ有意に高い(図1)。このことは本発明のG蛋白質共役型レセプターSREB1、SREB2 または SREB3 が既存のG蛋白質共役型レセプターとは独立した新規なG蛋白質共役型レセプターファミリーを形成していることを示している。

(実施例2)組織におけるヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子の発現分布

Northern blot hybridization 法により本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子の発現分布を解析した。ヒト SREB1 の probe には cDNA 断片(配列番号:1の第 722 番目から第 1054 番目)を用いた。ヒトの各臓器由来の poly A+ RNA(2 µg)をプロットしたメンブレン(Clontech 社)と probe の hybridization は 50% formamide、5 x SSPE、10 x Denhardt's 溶

液、2% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で、42°C (18 時間) で行った。メンブレンは、最終的に 0.2 x SSC、0.1% SDS を含む溶液で2回 (65°C、30 分) 洗浄した。ヒトの各臓器 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球) について Northern 解析を行ったところ、図2に示すように 3 kb の mRNA が脳、卵巣、精巣、心臓、前立腺で、3 kb と 2.3 kb の mRNA が末梢血白血球で検出された。また、膵臓でも 3 kb のシグナルが若干検出された。さらに、ヒト脳の各領域 (扁桃体、尾状核、脳梁、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質、延髄、脊髓、大脳皮質後頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、被殻) についても Northern 解析を行った。本発明の G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB1 遺伝子の 3 kb の mRNA は調べた全てのヒト脳領域で検出され、ヒト脳内で広範に発現していることがわかった (図3)。

ヒト SREB2 の probe には cDNA 断片 (配列番号: 3 の第 558 番目から第 888 番目) を用いた。上記同条件で Northern 解析を行ったところ、図4に示すように 3.2 kb の mRNA が脳で、2.4 kb、3.5 kb、6.3 kb の mRNA が精巣で検出された。また、3.5 kb のシグナルが胎盤、脾臓で、3.2 kb のシグナルが小腸で若干検出された。本発明の G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 遺伝子の 3.2 kb の mRNA は脳の中でも扁桃体、尾状核、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質群、被殻で多く検出され、脳梁、延髄、脊髓ではあまり検出されなかった。また、脳各領域で 7.8 kb のシグナルが若干検出された (図5)。

ヒト SREB3 の probe には cDNA 断片 (配列番号: 5 の第 1 番目から第 652 番目) を用いた。上記同条件で Northern 解析を行ったところ、図6に示すように 4 kb、5.1 kb の mRNA が脳で、4 kb、5.1 kb、9.7 kb の mRNA が卵巣で検出された。本発明の G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 遺伝子の mRNA は脳の各領域で 4 kb をメインに 5.1 kb、若干 9.7 kb のシグナルとして検出され、4 kb の mRNA は扁桃体、海馬、視床下核、小脳、大脳皮質で、5.1 kb の mRNA は黒質、視床下核、脊髓で比較的多く検出された (図7)。

以上の結果より、本発明の G 蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子 SREB1、SREB2 または SREB3 は中枢神経系、泌尿器生殖器系を中心に発現していることが示された。

(実施例3)ヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質の発現の確認

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pCEP4 (Invitrogen 社)を用いた。そのとき、ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 の N 末端にマーカ一配列として FLAG epitope を融合するために、SREB1、SREB2 または SREB3 の蛋白質コーディング配列の 5'末端に ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGATCCTG(配列番号: 13)を挿入した。このように構築したプラスミドはそれぞれ、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 とした。これらのプラスミドを用いることで、ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 のポリペプチドの N 末端に Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu(配列番号 14)が融合したポリペプチドが発現する。

10cm シャーレに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 1×10^6 細胞で播種して1日培養後、8 μ g の pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 および pCEP4-FL(ベクターのみ)を FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、一日培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl(pH7.4)/150 mM NaCl/コンプリート™ (Boeringer Mannheim 社)に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。ホモジェネートに最終濃度 0.2%、0.1%、0.2%になるように Triton X-100、Digitonin、sodium cholate を加え、4 °Cで2時間インキュベーションし、可溶化した。可溶化サンプルから M2-agarose(Sigma 社)を用いて FLAG epitope 融合蛋白を免疫沈降した。免疫沈降物を 200 μ M FLAG peptide/20 mM Tris-HCl(pH7.4)/150 mM NaCl で溶出した。溶出サンプルは濃縮後、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、マウス抗 FLAG モノクローナル抗体(M2; Sigma 社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Zymed 社)を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社製)を用いて SREB1、SREB2 または SREB3 蛋白質の発現を確認した(図8)。

抗 FLAG 抗体と反応する蛋白質は pCEP4-FL を導入した細胞には存在しないが、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 を導入した細胞では、35-45 kDa のバンドとして検出された。ヒト SREB1、ヒト SREB2、またはヒト SREB3 の推定分子量はそれぞれ、39.8 kDa、42.0 kDa、41.5 kDa であり、ほぼ予測される分子量にバンドが存在した。また、ヒト SREB1 では二量体と考えられる 65-75 kDa のバンドも検出された。

(実施例4)ラット SREB1(rSREB1)、ラット SREB2(rSREB2)、またはラット SREB3(rSREB3)蛋白質をコードする遺伝子の単離

rSREB1、rSREB2、又は rSREB3 をコードする全長 cDNA は、ラット脳由来の poly A+ RNA(Clontech 社)を template として RT-PCR により取得した。

rSREB1 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACGGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3'(配列番号:15)、reverse primer と し て 5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3'(配列番号:16)を用いた(それぞれの5'末端には XbaI site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号:21に示す。

同配列は1131 base の open reading frame(配列番号:21の第1番目から第1131番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(377 アミノ酸)を配列表 配列番号:22に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB1 と 97%一致していることから、本遺伝子が rSREB1 をコードすることが解った。

rSREB2 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGATCTATGGCGAACTATAGCCATGC-3' (配列番号:17)、reverse primer と し て 5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3'(配列番号:18)を用いた(それぞれの5'末端には XbaI site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩

基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号:23に示す。

同配列は1110 base の open reading frame(配列番号:23の第1番目から第1110番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(370 アミノ酸)を配列表 配列番号:24に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB2 と100%一致していることから、本遺伝子が rSREB2 をコードすることが解った。

rSREB3 の 増 幅 に は forward primer と し て 5'-AAAATCTAGACAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3'(配列番号:19)、reverse primer として 5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3'(配列番号:20)を用いた(それぞれの5'末端には XbaI site が付加してある)。cDNA の増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号:25に示す。

同配列は1119 base の open reading frame(配列番号:25の第1番目から第1119番目)を持っている。open reading frame から予測されるアミノ酸配列(373 アミノ酸)を配列表 配列番号:26に示す。予想アミノ酸配列はヒト SREB3 と99%一致していることから、本遺伝子が rSREB3 をコードすることが解った。

実施例 5 ヒト SREB1 に対する抗体の作製

ヒト SREB1 に対する抗体を作製するための免疫用抗原としてヒト SREB1 の部分アミノ酸配列をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と融合したものを用いた。実際には、ヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域(3LO)および351番目から375番目の領域(C24)に相当する cDNA フラグメントに制限酵素 BamHI および XhoI 切断部位を結合した形でPCR法にて増幅し、GST Gene Fusion Vector(pGEX-5X-1: アマシャムファルマシア社製)の BamHI、XhoI の間に挿入した。このように構築したプラスミドで、大腸菌 BL21(DE3) pLysS(Novagen 社製)のコンピテントセルを形質転換した。その

形質転換株を培養し、1mM IPTG にて発現誘導することで、GST-3LO 融合蛋白および GST-C24 融合蛋白を大腸菌内に発現させた。GST-3LO および GST-C24 は大腸菌破砕物から Glutathione Sepharose4B(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて精製した。

精製した GST-3LO 融合蛋白と Freund's complete adjuvant(CalBioChem 社)を等量混合しエマルジョン化したものを白色レグホン雌(140日齢)のフォアブリキュウス囊付近に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ4回投与した。最終免疫後、採卵し、卵黄を生理食塩水で希釈後、デキストラン硫酸を用いて脱脂した後、DEAE Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて、IgY を精製し抗 3LO 抗体とした。また、精製した GST-C24 融合蛋白は TiterMax Gold(CytRX 社)と等量混合しエマルジョン化したものを日本白色ウサギ(6週齢)の背部皮下に投与した。投与量は初回が 1mg でその後2週間おきに 0.5mg ずつ2回投与した。最終免疫後、採血し、血清から、ProteinG Sepharose(アマシャムファルマシア社製)を用いて使用説明書に準じて、IgG を精製し抗 C24 抗体とした。

抗 3LO 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の208番目から282番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB1、SREB2または SREB3 で共通する配列を多く含むこと(図1参照)から、抗 3LO 抗体は SREB1、SREB2 または SREB3 を共通に認識する可能性が考えられる。また、抗 C24 抗体はヒト SREB1 のアミノ酸配列(配列番号2)の351番目から375番目の領域を抗原としていること、この部分アミノ酸配列は SREB2、3 には存在せず SREB1 にのみ存在する配列であること(図1参照)から、抗 C24 抗体は SREB1 のみを認識する可能性が考えられる。そこで、抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体の特異性を確認するために、実施例3で調製した SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させた 293-EBNA の抗 FLAG 抗体の免疫沈降物と抗 3LO 抗体および抗 C24 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

実際には、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社)を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング後、

10 $\mu\text{g/ml}$ の抗 3LO 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ニワトリ IgG ポリクローナル抗体(Zym d 社)を順次反応させるか、または、10 $\mu\text{g/ml}$ の抗 C24 抗体、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体(MBL 社)を順次反応させるかした。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム(アマシャムファルマシア社製)を用いて発色させた。抗 3LO 抗体と反応するバンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、または pCEP4-FL-SREB3 を導入した細胞で検出された(図9)。また、抗 C24 抗体と反応するバンドは実施例3の抗 FLAG 抗体と同等の位置に pCEP4-FL-SREB1 を導入した細胞にのみ検出された(図10)。

以上の結果より、抗 3LO 抗体は SREB1、SREB2 または SREB3 を認識する抗体であり、抗 C24 抗体は SREB1 のみを認識する抗体であることが示された。これらの抗体を用いることで、ウェスタンブロット法や免疫組織染色法等で天然の SREB1、SREB2 または SREB3 を検出することが可能となった。

実施例6 ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞における cAMP-response element(CRE)、serum response element(SRE)を介した転写活性の検討

CRE あるいは SRE を介した転写活性の上昇は、様々な G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化に伴って引き起こされる(Lolait, S.J., et al. (1992) *Nature*, 357, 336-339; Hoeltzel, W.L., et al. (1997) *Am. J. Physiol.*, 273, C2037-C2045; An, S., et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 7906-7910)。また、G 蛋白質共役型レセプターはアゴニスト非存在下でも一部の遷移的な活性型コンフォメーションを介して細胞内情報伝達系が部分的に活性化されることが知られている(Kenakin, T. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.*, 16, 188-192)。これらのことより、アゴニスト非存在下でも、SREB1、SREB2 または SREB3 導入細胞での CRE および SRE を介した転写活性の変化が見いだされれば、該 G 蛋白質共役型レセプターが機能的であること、また、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE および SRE を介した転写活性とつながることを証明できる。

ヒト SREB1、SREB2 または SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS

(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)を用い、pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 を作製した。24 ウェルプレートに 293-EBNA(Invitrogen 社)を 8×10^4 細胞で播種して1日培養後、250 ng の pEF-BOS-SREB1、pEF-BOS-SREB2、pEF-BOS-SREB3 および pEF-BOS(ベクターのみ)を 25 ng の CRE-reporter plasmid pCRE-Luc(Stratagene 社)あるいは SRE-reporter plasmid pSRE-Luc(Stratagene 社)と共に FuGENE6(Boeringer Mannheim 社)を用いて遺伝子導入した(各 3 ウェル)。遺伝子導入後、12 時間ごとに PicaGene Cell Culture Lysis Reagent Luc(ニッポンジーン社)を用いて細胞を溶解し、PicaGene Luminescence Kit(ニッポンジーン社)を用いて各 reporter plasmid から産生されるルシフェラーゼ活性を測定した。

遺伝子導入後 24 時間における SREB1、SREB2 または SREB3 を導入した細胞のルシフェラーゼ活性を、ベクターのみを導入した細胞(コントロール)のルシフェラーゼ活性に対する相対活性(コントロールを 1 とする)として処理した結果を図11(pCRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)、図12(pSRE-Luc 由来のルシフェラーゼ活性)に示す。CRE を介した転写活性は SREB1 導入細胞で最も上昇し、SREB2、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。一方、SRE を介した転写活性は SREB2 導入細胞で最も上昇し、SREB1、SREB3 導入細胞でもコントロールに対して有意に上昇していた。

これらの結果により SREB1、SREB2 または SREB3 が機能的レセプターであり、該 G 蛋白質共役型レセプターの細胞内情報伝達系の活性化が CRE あるいは SRE を介した転写活性の上昇につながることを示された。

産業上の利用可能性

本発明により、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質 SREB1、SREB2 または SREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法が提供された。

また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験薬を接触させることにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物、ペプチド及び抗体をスクリーニングし、新たな医薬、特に、新たな中枢性疾患治療剤をスクリーニングすることを可能にした。

本発明の中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は、中枢神経系の機能性／器質性疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質は中枢神経系のみならず、泌尿器生殖器系で発現していることから、その活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は泌尿器生殖器系に関わる疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターの内例えば SREB1 蛋白質は中枢神経系、泌尿器生殖器系に加え、心臓、末梢白血球で発現していることから SREB1 蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物、ペプチド及び抗体を有効成分とする医薬は中枢性疾患、泌尿器生殖器系に関わる疾患に加え循環器系疾患、免疫炎症系疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。

本発明新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 はヒトとラットでアミノ酸の保存率が極めて高い。この保存率は既存のG蛋白質共役型レセプターファミリーの中で最も高く、このことは新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2、及び SREB3 の生体内での役割、特に中枢神経系での生理的役割の重要性を示していると考えられる。また、ヒトとラットでアミノ酸配列が 97%以上の保存率を示していることから、本新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2 または SREB3 に作用する薬物の活性には種差が殆ど無いと考えられる。従って、本発明のG蛋白質共役型レセプターは、それ自体又は当該レセプターを用いたスクリーニングから得られた化合物又は蛋白質を医薬として開発する際、ヒトに対する薬理効果を試験するに先立って、予め、例えばラット等の動物実験を行うことができるという利点があり、動物実験データからデータからヒトの臨床データを予測することが容易である点で有用である。

本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体は、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の臓器での発現およびその変動を ELISA アッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット法等によって検出することが可能であり、診断薬として有用である。また、該新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する抗体は該新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質が関与する疾患の治療薬として、さらに該レセプター蛋白質の分離精製の道具としても有用である。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質。
2. 配列番号:2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質。
3. 請求の範囲1に記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。
4. 請求の範囲3記載の遺伝子を含むベクター。
5. 請求の範囲4記載のベクターを含む宿主細胞。
6. 請求の範囲5記載の宿主細胞を用いる請求の範囲1または乃至2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法。
7. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験化合物とを接触させ、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質作用薬をスクリーニングする方法。
8. 請求の範囲1または2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体またはその断片。

1/10

21

SREB 1 MANASEPGGSGGGEAAALG---LKLATLSLLLCVSLAGN 36
 SREB 2 MANYSHAADNILQNLSP--LTAFLKLTSLGFIIGVSVVGN 38
 SREB 3 MANTTTGEPEEVSGALSPPSASAYVKLVLLGLIMCVSLAGN 40

SREB 1 VLFALLIVRERSLHRAPYYLLDLCLADGLRALACLPAVM 76
 SREB 2 LLISILLVKDKTLHRAPYYFLDLCCSDILRSAICFPFVF 78
 SREB 3 AILSLLVLKERALHKAPYYFLDLCLADGIRSAVCFPFVL 80

SREB 1 LAARRAAAAAGAPP GALGCKLLAFLAALFCFHAAFLLLGV 116
 SREB 2 NSVKNGSTWTY---GTLTCKVIAFLGVLSCFHTAFMLFCI 115
 SREB 3 ASVRHGSSTWTF---SALSCKIVAFMAVLFCHAAFMFLCI 117

SREB 1 GVTRYLAIAHHRFYAERLAGWPCAAMLVCAAWALALAAAF 156
 SREB 2 SVTRYLAIAHHRFYTKRLTFWTCLAV-ICMVWTLVAMAF 154
 SREB 3 SVTRYMAIAHHRFYAKRMTLWTCAAV-ICMAWTLVAMAF 156

SREB 1 PPVLDGGG---DDEDAPCALEQRPDGAPGALGFLLLLAVV 193
 SREB 2 PPVLDVGTYSFIREEDQCTFQHRSFANDSLGFMLLLALI 194
 SREB 3 PPVFDVGTYKFIREEDQCTFEHRYFKANDTLGFMLMLAVL 196

SREB 1 VGATHLVYLRLLFFIHDRRKMRPARLVPAVSHDWTFHGPG 233
 SREB 2 LLATQLVYLKLIFEVHDRRKMKPVQFVAAVSONWTFHGPG 234
 SREB 3 MAATHAVYGKLLLFEYRHRKMKPVQMVPAAISONWTFHGPG 236

SREB 1 ATGQAAANWTAGFGRGPTPPALVGIRPAGPGRGARRRLLVL 273
 SREB 2 ASGQAAANWLAGFGRGPTPPTLLGIRONANTTGRRRLLVL 274
 SREB 3 ATGQAAANWTAGFGRGPMPTLLGIRONGHAAARR-LLGM 275

SREB 1 EEFKTEKRLCKMIFYAVTLLFLLWGPYVVASYLRLVLVRPG 313
 SREB 2 DEFKMEKRISRMEFYIMTELEFLTWGPYLVACYWRVFARGP 314
 SREB 3 DEVKGEKQLGRMEFYATITLLFLLWSPYIVACYWRVFVKAC 315

SREB 1 AVPQAAYLTASVWLTFAQAGINPVVCFLFNRELRCDFRAQF 353
 SREB 2 VPPGGFLTAAVWMSFAQAGINPVFCIFSNRELRCFSTTL 354
 SREB 3 AVPHRYLATAVWMSFAQAAVNPVVCFLLNKDLKKCLRTHA 355

SREB 1 PCCQSPRTTQAATHP--CDLKGIGL. 376
 SREB 2 LYCRKS---RLPREPYC-----VI. 371
 SREB 3 P-CWGTGGAPAPREPYC-----VM. 374

2/10

図2

9.5-
7.5-
4.4-
2.4-
1.4-

心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓

9.5-
7.5-
4.4-
2.4-
1.4-

脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巢
小腸
大腸
末梢白血球

3/10

図3

1.4—

2.4—

4.4—

7.5—

9.5—



1.4—

2.4—

4.4—

7.5—

9.5—



扁桃体
尾状核
脳梁
海馬
全脳
黒質
視床下核
視床

小脳
大脳皮質
延髄
脊髓
大脳皮質後頭葉
大脳皮質前頭葉
大脳皮質側頭葉
被殻

4/10

図4

9.5-
7.5-
4.4-
2.4-
1.4-



心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓

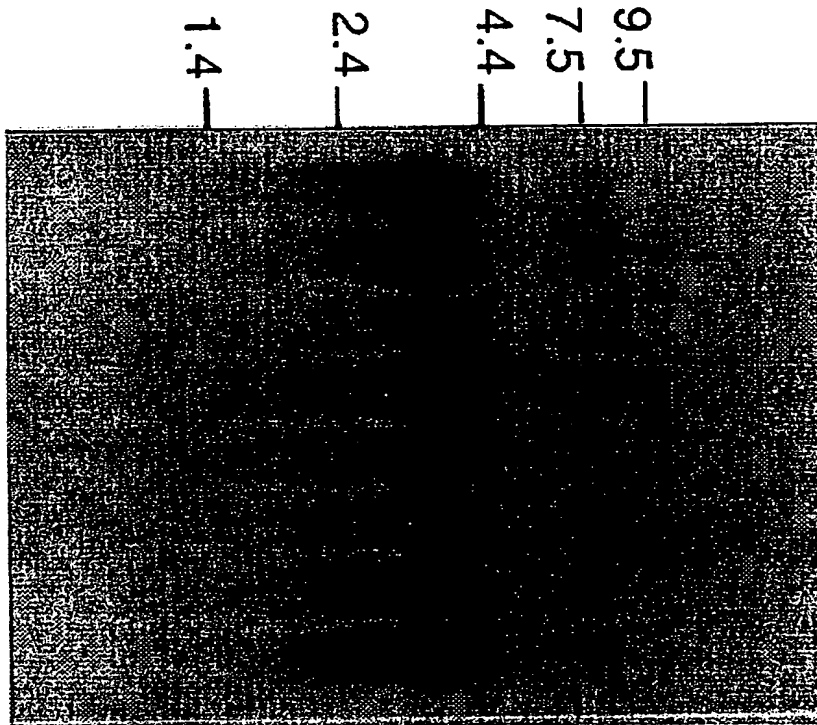
9.5-
7.5-
4.4-
2.4-
1.4-



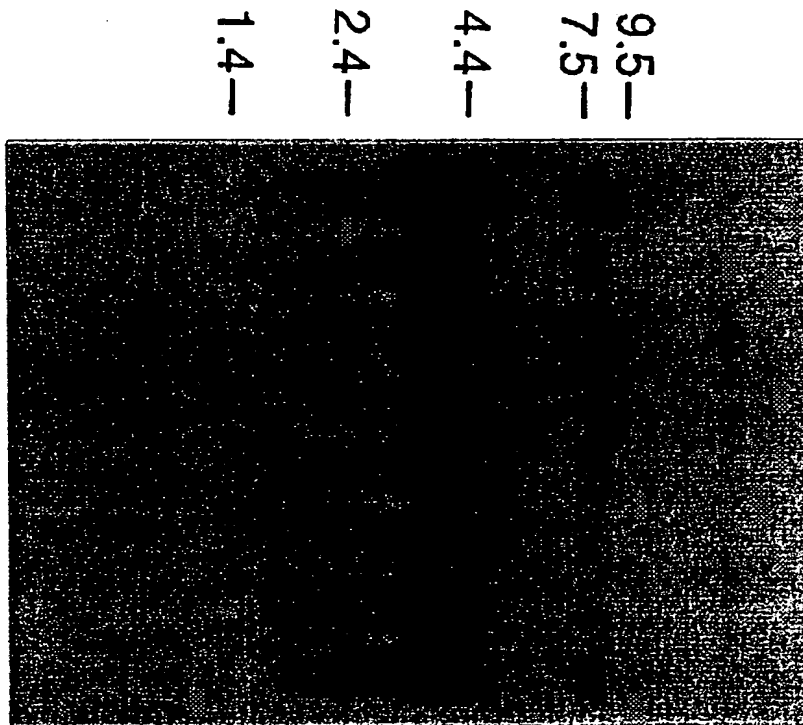
脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巣
小腸
大腸
末梢血白血球

5/10

図5



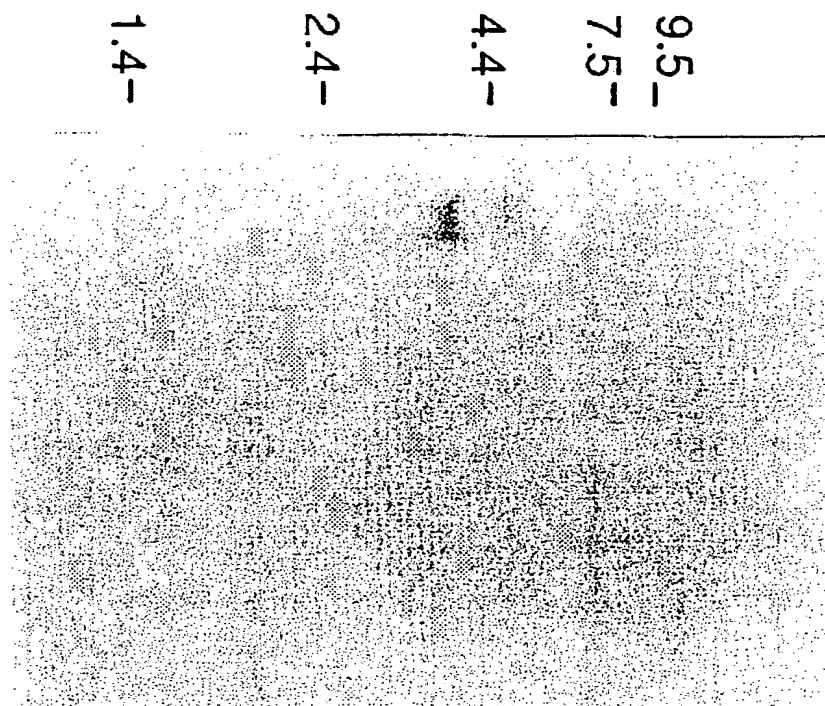
扁桃体
尾状核
脳梁
海馬
全脳
黒質
視床下核
視床



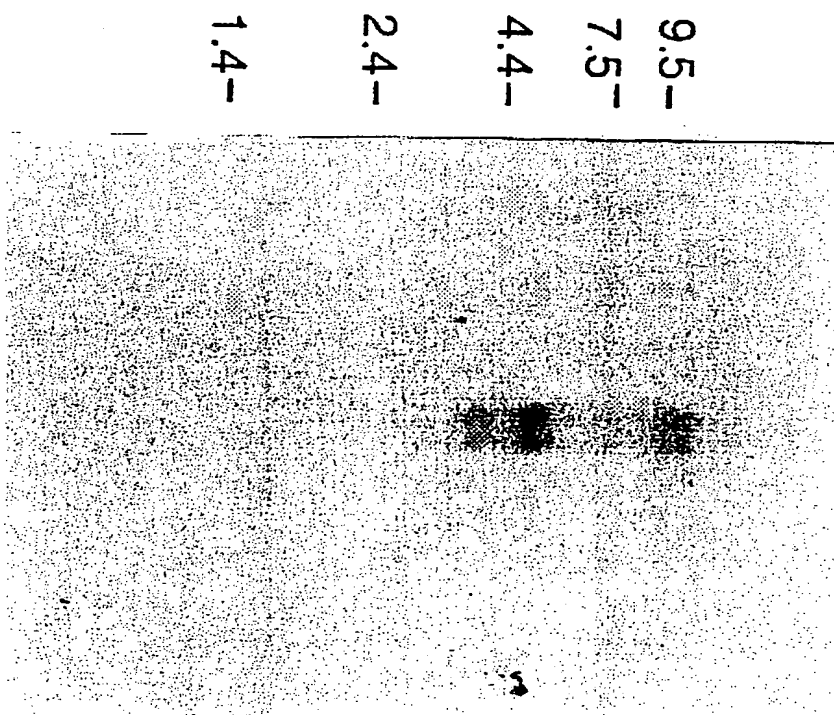
小脳
大腦皮質
延髄
脊髓
大腦皮質後頭葉
大腦皮質前頭葉
大腦皮質側頭葉
被殻

6/10

図6



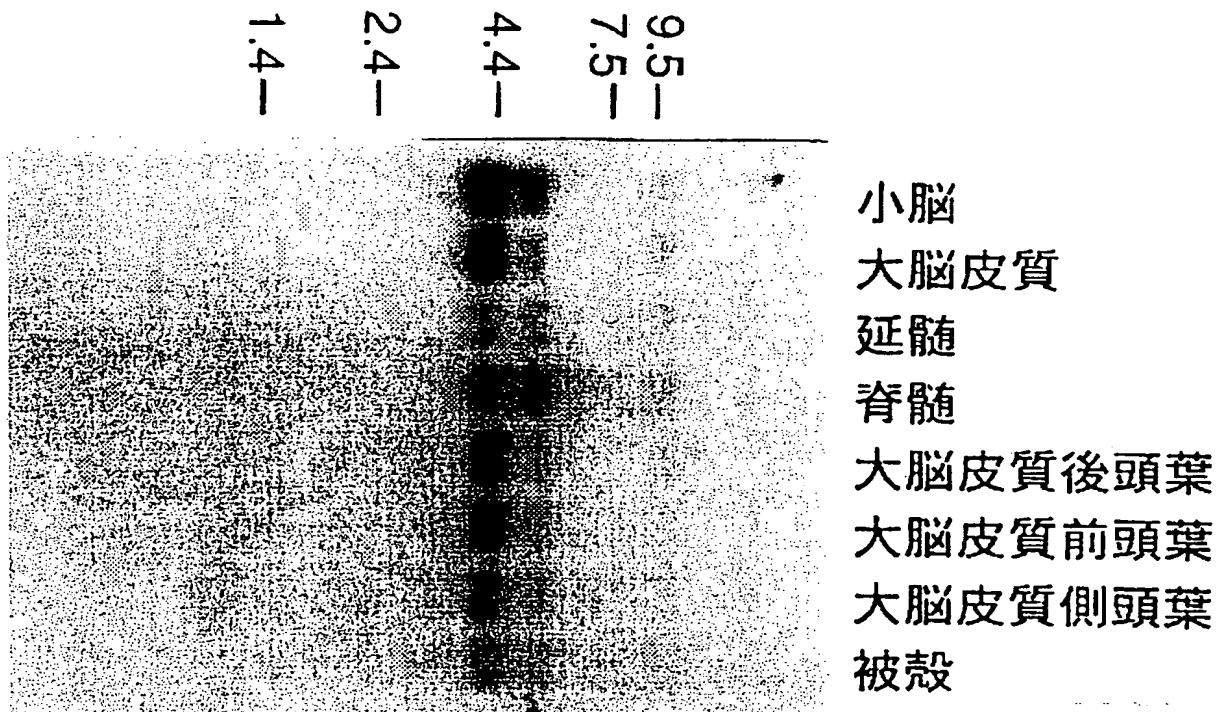
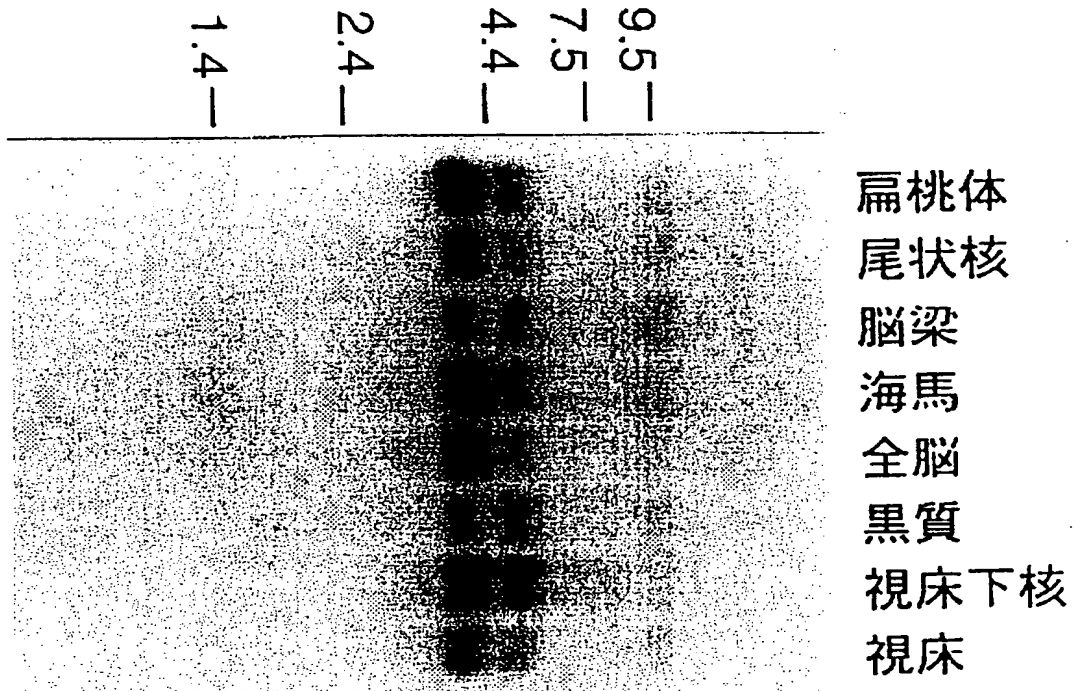
心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓



脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巣
小腸
大腸
末梢血白血球

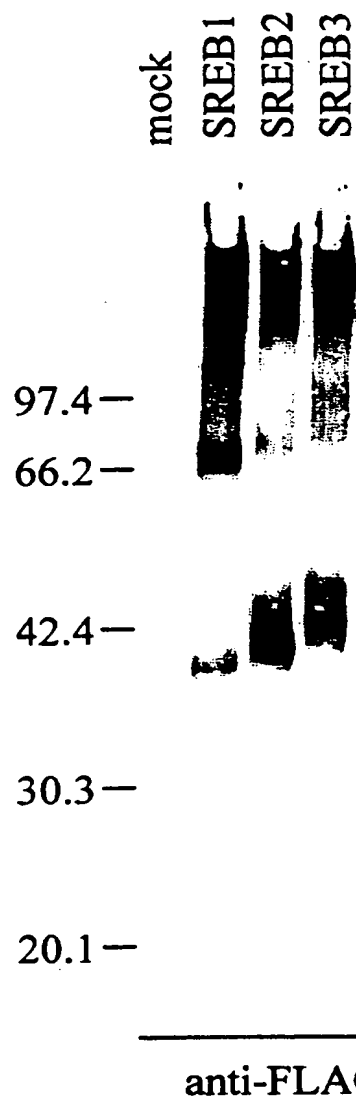
7/10

図7



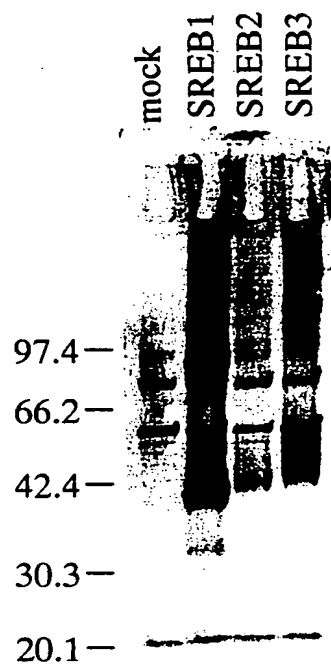
8/10

図8



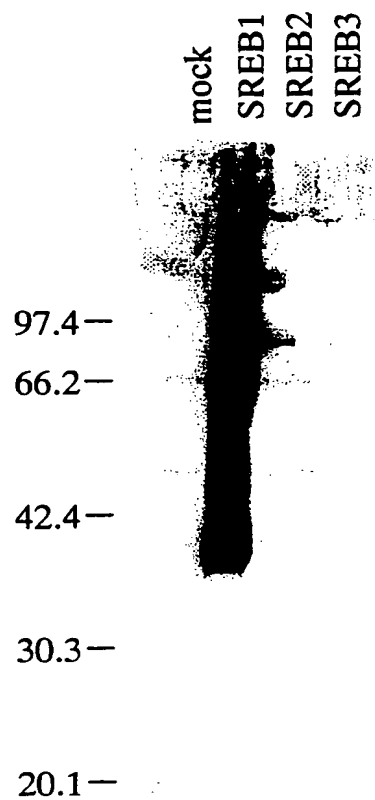
9/10

図9



anti-3LO

図10



anti-C24

10/10

図 11

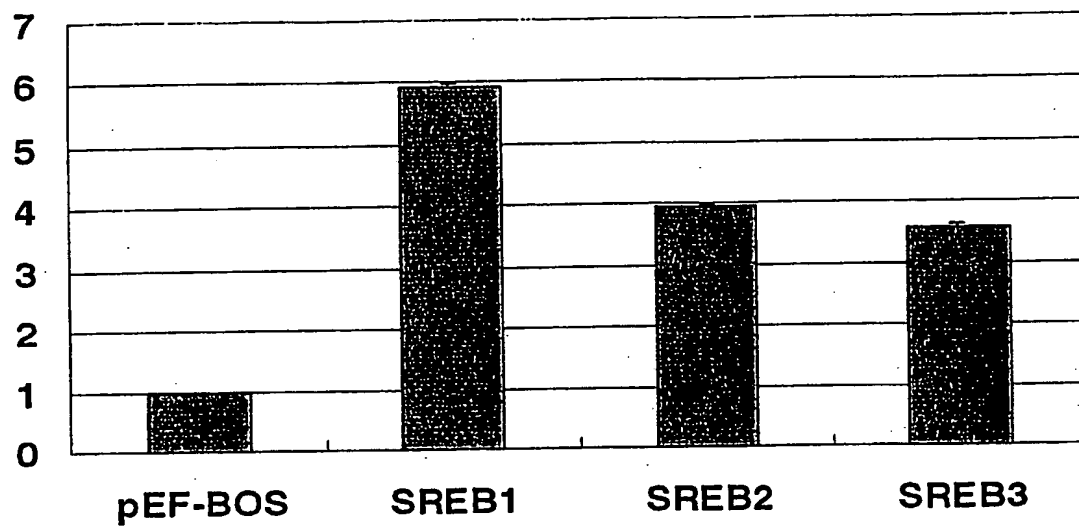
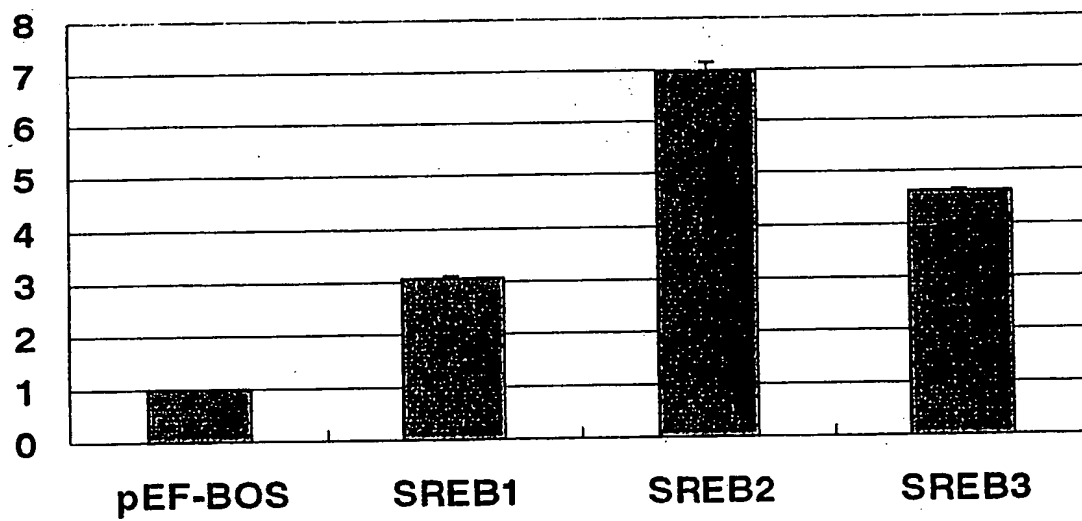


図 12



1/24

SEQUENCE LIST

- <110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
 <120> A novel G protein coupled receptor protein
 <130> Y9905-PCT
 <150> JP P1998-060245
 <151> 1998-03-12
 <150> JP P1999-026774
 <151> 1999-02-03
 <160> 26
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1125)
 <223> SREB1

<400> 1

atg gcg aac gcg agc gag ccg ggt ggc agc ggc ggc ggc gag gcg gcc	48
Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg ggc ctc aag ctg gcc acg ctc agc ctg ctg ctg tgc gtg agc	96
Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser	
20 25 30	
cta gcg ggc aac gtg ctg ttc gcg ctg ctg atc gtg cgg gag cgc agc	144
Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser	
35 40 45	
ctg cac cgc gcc ccg tac tac ctg ctg ctc gac ctg tgc ctg gcc gac	192
Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp	
50 55 60	
ggg ctg cgc gcg ctc gcc tgc ctc ccg gcc gtc atg ctg gcg gcg cgg	240
Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg	
65 70 75 80	
cgt gcg gcg gcc gcg gcg ggg gcg ccg ccg ggc gcg ctg ggc tgc aag	288
Arg Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys	
85 90 95	
ctg ctc gcc ttc ctg gcc gcg ctc ttc tgc ttc cac gcc gcc ttc ctg	336
Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu	
100 105 110	

2/24

ctg ctg ggc gtg ggc gtc acc cgc tac ctg gcc atc gcg cac cac cgc	384
Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg	
115 120 125	
ttc tat gca gag cgc ctg gcc ggc tgg ccg tgc gcc gcc atg ctg gtg	432
Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val	
130 135 140	
tgc gcc gcc tgg gcg ctg gcg ctg gcc gcg gcc ttc ccg cca gtg ctg	480
Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu	
145 150 155 160	
gac ggc ggt ggc gac gac gag gac gcg ccg tgc gcc ctg gag cag cgg	528
Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg	
165 170 175	
ccc gac ggc gcc ccc ggc gcg ctg ggc ttc ctg ctg ctg ctg gcc gtg	576
Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu Ala Val	
180 185 190	
gtg gtg ggc gcc acg cac ctc gtc tac ctc cgc ctg ctc ttc ttc atc	624
Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe Ile	
195 200 205	
cac gac cgc cgc aag atg cgg ccc gcg cgc ctg gtg ccc gcc gtc agc	672
His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser	
210 215 220	
cac gac tgg acc ttc cac ggc ccg ggc gcc acc ggc cag gcg gcc gcc	720
His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala	
225 230 235 240	
aac tgg acg gcg ggc ttc ggc cgc ggg ccc acg ccg ccc gcg ctt gtg	768
Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val	
245 250 255	
ggc atc cgg ccc gca ggg ccg ggc cgc ggc gcg cgc cgc ctc ctc gtg	816
Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val	
260 265 270	
ctg gaa gaa ttc aag acg gag aag agg ctg tgc aag atg ttc tac gcc	864
Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala	
275 280 285	
gtc acg ctg ctc ttc ctg ctc ctc tgg ggg ccc tac gtc gtg gcc agc	912
Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser	
290 295 300	
tac ctg cgg gtc ctg gtg cgg ccc ggc gcc gtc ccc cag gcc tac ctg	960
Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala Tyr Leu	
305 310 315 320	
acg gcc tcc gtg tgg ctg acc ttc gcg cag gcc ggc atc aac ccc gtc	1008
Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro Val	
325 330 335	

3/24

gtg tgc ttc ctc ttc aac agg gag ctg agg gac tgc ttc agg gcc cag 1056
 Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln
 340 345 350

ttc ccc tgc tgc cag agc ccc cgg acc acc cag gcg acc cat ccc tgc 1104
 Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys
 355 360 365

gac ctg aaa ggc att ggt tta tga 1128
 Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu
 370 375

<210> 2
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser
 20 25 30

Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser
 35 40 45

Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp
 50 55 60

Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg
 65 70 75 80

Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys
 85 90 95

Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu
 100 105 110

Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg
 115 120 125

Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val
 130 135 140

Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu
 145 150 155 160

Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg
 165 170 175

Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu Ala Val
 180 185 190

4/24

Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe Ile
195 200 205

His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser
210 215 220

His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala
225 230 235 240

Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val
245 250 255

Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val
260 265 270

Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala
275 280 285

Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser
290 295 300

Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala Tyr Leu
305 310 315 320

Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro Val
325 330 335

Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln
340 345 350

Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys
355 360 365

Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu
370 375

<210> 3
<211> 1113
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1110)
<223> SREB2

<400> 3
atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg 48
Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser
1 5 10 15

cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga 96
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly
20 25 30

5/24

gtc agc gtg gtg ggc aac ctc ctg atc tcc att ttg cta gtg aaa gat	144
Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp	
35 40 45	
aag acc ttg cat aga gca cct tac tac ttc ctg ttg gat ctt tgc tgt	192
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys	
50 55 60	
tca gat atc ctc aga tct gca att tgt ttc cca ttt gtg ttc aac tct	240
Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser	
65 70 75 80	
gtc aaa aat ggc tct acc tgg act tat ggg act ctg act tgc aaa gtg	288
Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val	
85 90 95	
att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gct ttc atg ctc	336
Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu	
100 105 110	
ttc tgc atc agt gtc acc aga tac tta gct atc gcc cat cac cgc ttc	384
Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe	
115 120 125	
tat aca aag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ctg gct gtg atc tgt atg	432
Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met	
130 135 140	
gtg tgg act ctg tct gtg gcc atg gca ttt ccc ccg gtt tta gac gtg	480
Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val	
145 150 155 160	
ggc act tac tca ttc att agg gag gaa gat caa tgc acc ttc caa cac	528
Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His	
165 170 175	
cgc tcc ttc agg gct aat gat tcc tta gga ttt atg ctg ctt ctt gct	576
Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala	
180 185 190	
ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttc	624
Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe	
195 200 205	
gtc cac gat cga aga aaa atg aag cca gtc cag ttt gta gca gca gtc	672
Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val	
210 215 220	
agc cag aac tgg act ttt cat ggt cct gga gcc agt ggc cag gca gct	720
Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala	
225 230 235 240	
gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg	768
Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu	
245 250 255	

[illegible]

<400> 4
Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser
1 5 10 15
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly
20 25 30
Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp
35 40 45
Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys
50 55 60
Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser
65 70 75 80
Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val
85 90 95

7/24

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu
 100 105 110
 Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe
 115 120 125
 Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met
 130 135 140
 Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His
 165 170 175
 Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala
 180 185 190
 Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe
 195 200 205
 Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val
 210 215 220
 Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu
 245 250 255
 Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu
 260 265 270
 Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr
 275 280 285
 Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala
 290 295 300
 Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe
 305 310 315 320
 Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro
 325 330 335
 Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr
 340 345 350
 Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys
 355 360 365
 Val Ile
 370

8/24

<210> 5
 <211> 1122
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1119)
 <223> SREB3

<400> 5
 atg gcc aac act acc gga gag cct gag gag gtg agc ggc gct ctg tcc 48
 Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser
 1 5 10 15

cca ccg tcc gca tca gct tat gtg aag ctg gta ctg ctg gga ctg att 96
 Pro Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile
 20 25 30

atg tgc gtg agc ctg gcg ggt aac gcc atc ttg tcc ctg ctg gtg ctc 144
 Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu
 35 40 45

aag gag cgt gcc ctg cac aag gct cct tac tac ttc ctg ctg gac ctg 192
 Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu
 50 55 60

tgc ctg gcc gat ggc ata cgc tct gcc gtc tgc ttc ccc ttt gtg ctg 240
 Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Val Cys Phe Pro Phe Val Leu
 65 70 75 80

gct tct gtg cgc cac ggc tct tca tgg acc ttc agt gca ctc agc tgc 288
 Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys
 85 90 95

aag att gtg gcc ttt atg gcc gtg ctc ttt tgc ttc cat gcg gcc ttc 336
 Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe
 100 105 110

atg ctg ttc tgc atc agc gtc acc cgc tac atg gcc atc gcc cac cac 384
 Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His
 115 120 125

cgc ttc tac gcc aag cgc atg aca ctc tgg aca tgc gcg gct gtc atc 432
 Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile
 130 135 140

tgc atg gcc tgg acc ctg tct gtg gcc atg gcc ttc cca cct gtc ttt 480
 Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe
 145 150 155 160

gac gtg ggc acc tac aag ttt att cgg gag gag gac cag tgc atc ttt 528
 Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe
 165 170 175

gag cat cgc tac ttc aag gcc aat gac acg ctg ggc ttc atg ctt atg 576

9/24

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met	
180 185 190	
ttg gct gtg ctc atg gca gct acc cat gct gtc tac ggc aag ctg ctc	624
Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu	
195 200 205	
ctc ttc gag tat cgt cac cgc aag atg aag cca gtg cag atg gtg cca	672
Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro	
210 215 220	
gcc atc agc cag aac tgg aca ttc cat ggt ccc ggg gcc acc ggc cag	720
Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln	
225 230 235 240	
gct gct gcc aac tgg atc gcc ggc ttt ggc cgt ggg ccc atg cca cca	768
Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro	
245 250 255	
acc ctg ctg ggt atc cgg cag aat ggg cat gca gcc agc cgg cgg cta	816
Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu	
260 265 270	
ctg ggc atg gac gag gtc aag ggt gaa aag cag ctg ggc cgc atg ttc	864
Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe	
275 280 285	
tac gcg atc aca ctg ctc ttt ctg ctc ctc tgg tca ccc tac atc gtg	912
Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val	
290 295 300	
gcc tgc tac tgg cga gtg ttt gtg aaa gcc tgt gct gtg ccc cac cgc	960
Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg	
305 310 315 320	
tac ctg gcc act gct gtt tgg atg agc ttc gcc cag gct gcc gtc aac	1008
Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn	
325 330 335	
cca att gtc tgc ttc ctg ctc aac aag gac ctc aag aag tgc ctg agg	1056
Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg	
340 345 350	
act cac gcc ccc tgc tgg ggc aca gga ggt gcc ccg gct ccc aga gaa	1104
Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu	
355 360 365	
ccc tac tgt gtc atg tga	1122
Pro Tyr Cys Val Met	
370	

<210> 6
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10/24

<400> 6

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile
 20 25 30

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu
 35 40 45

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu
 50 55 60

Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Val Cys Phe Pro Phe Val Leu
 65 70 75 80

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys
 85 90 95

Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe
 100 105 110

Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His
 115 120 125

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile
 130 135 140

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe
 145 150 155 160

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe
 165 170 175

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met
 180 185 190

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu
 195 200 205

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro
 210 215 220

Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro
 245 250 255

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu
 260 265 270

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe
 275 280 285

11/24

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val
 290 295 300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg
 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn
 325 330 335

Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg
 340 345 350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Tyr Cys Val Met
 370

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 7

aaaatctaga cgcatggcg aacgcgagcg a

31

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 8

aaaatctaga gtctatgtgg cggggcctcc c

31

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 9

aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgca

34

<210> 10

12/24

<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 10
aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc

35

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 11
aaaatctaga gtatggccaa cactaccgga gag

33

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 12
aaaatctaga cctgtctgcc taccagcctg c

31

<210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope

<400> 13
atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg

36

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope

<400> 14

13/24

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 15
aaaatctaga cggcgatggc gaacgctagt ga 32

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 16
aaaatctaga cactttgaga gtcttgtaa ggc 33

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 17
aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgc 33

<210> 18
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 18
aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc 35

<210> 19
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

14/24

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 19

aaaatctaga caaatactga actggccgat cccc

34

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 20

aaaatctaga tgttggcccc agtatggtga tcat

34

<210> 21

<211> 1134

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1131)

<223> Rat SREB1

<400> 21

atg	gcg	aac	gct	agt	gag	ccg	ggc	ggc	ggc	ggc	ggc	ggg	gcc	gag	gct	48
Met	Ala	Asn	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	
1			5				10						15			

gcc	gcg	ctg	ggc	ctc	agg	ctg	gcc	aca	ctc	agc	ctg	ctg	ctg	tgc	gtg	96
Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	
		20				25							30			

agc	ctg	gcg	ggc	aac	gtg	ctg	ttc	gct	ctg	ctc	atc	gtg	agg	gag	cgc	144
Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Leu	Phe	Ala	Leu	Leu	Ile	Val	Arg	Glu	Arg	
	35					40						45				

agc	ctg	cac	cgc	gcg	cct	tac	tac	ctg	ctg	ctc	gac	ctg	tgc	ctg	gcc	192
Ser	Leu	His	Arg	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Cys	Leu	Ala	
	50					55					60					

gac	ggg	ctg	cgc	gcg	ctc	gcc	tgt	ctc	ccg	gcc	gtc	atg	ctg	gct	gcg	240
Asp	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Pro	Ala	Val	Met	Leu	Ala	Ala	
65				70				75						80		

cgg	cgc	gcg	gca	gcc	gcg	gcg	ggg	acg	cct	ccg	ggt	gcg	ctg	ggc	tgc	288
Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Pro	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Cys	
			85				90						95			

aag	ctg	ctg	gcc	ttc	ctg	gcc	gcg	ctc	ttc	tgc	ttc	cac	gcg	gcc	ttc	336
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

15/24

Lys	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Cys	Phe	His	Ala	Ala	Phe		
			100					105					110				
ctg	ctg	ctg	ggc	gtg	ggc	gtc	acc	cgc	tac	ctg	gcc	atc	gct	cac	cac	384	
Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ala	His	His		
			115				120					125					
cgc	ttc	tat	gcc	gag	cgc	ctg	gcc	ggc	tgg	ccg	tgc	gcc	gcg	atg	ctg	432	
Arg	Phe	Tyr	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Trp	Pro	Cys	Ala	Ala	Met	Leu		
			130				135					140					
gtg	tgc	gcc	gcc	tgg	gcg	ctg	gct	tgg	gcc	gcg	gcc	ttc	ccg	ccg	gtg	480	
Val	Cys	Ala	Ala	Trp	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Phe	Pro	Pro	Val		
							150				155				160		
ctg	gac	ggc	ggt	ggc	gcg	gac	gac	gag	gat	gcg	ccg	tgc	gcc	ctg	gag	528	
Leu	Asp	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Asp	Glu	Asp	Ala	Pro	Cys	Ala	Leu	Glu		
				165					170						175		
cag	cgg	ccc	gac	ggc	gcc	ccg	ggt	gcg	cta	ggc	ttc	ctg	ctg	ctc	ctg	576	
Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu		
			180					185						190			
gcc	gcg	gtg	gtg	ggc	gcc	acg	cac	ctc	gtc	tac	ctt	cgc	ctg	ctc	ttc	624	
Ala	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Thr	His	Leu	Val	Tyr	Leu	Arg	Leu	Leu	Phe		
				195				200					205				
ttc	atc	cac	gac	cgc	cgc	aag	atg	cgg	ccc	gca	cgc	ctg	gtg	ccc	gcc	672	
Phe	Ile	His	Asp	Arg	Arg	Lys	Met	Arg	Pro	Ala	Arg	Leu	Val	Pro	Ala		
			210				215					220					
gtc	agc	cac	gac	tgg	acc	ttc	cac	ggc	ccg	ggc	gcc	acc	ggt	caa	gcg	720	
Val	Ser	His	Asp	Trp	Thr	Phe	His	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Gly	Gln	Ala		
							230			235					240		
gcc	gcc	aac	tgg	acg	gcg	ggc	ttc	ggc	cgc	ggg	ccc	acg	cca	cct	gcg	768	
Ala	Ala	Asn	Trp	Thr	Ala	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Ala		
				245					250						255		
ctc	gtg	ggc	atc	agg	cct	gca	ggc	ccg	ggc	cgc	gga	gcc	cgg	cgc	ctc	816	
Leu	Val	Gly	Ile	Arg	Pro	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu		
				260				265						270			
ctg	gtg	ctg	gag	gaa	ttc	aag	acg	gag	aag	agg	ctg	tgc	aag	atg	ttc	864	
Leu	Val	Leu	Glu	Glu	Phe	Lys	Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Cys	Lys	Met	Phe		
				275				280					285				
tac	gcc	atc	acg	ctg	ctc	ttc	ctg	ctc	ctc	tgg	ggg	ccc	tat	gtg	gtt	912	
Tyr	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Gly	Pro	Tyr	Val	Val		
				290				295				300					
gcc	agt	tac	ctg	cgc	gtc	ctg	gtg	cgg	ccc	gga	gct	gtc	ccg	cag	gcc	960	
Ala	Ser	Tyr	Leu	Arg	Val	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Val	Pro	Gln	Ala		
						310				315					320		
tac	ctg	aca	gcc	tcg	gtg	tgg	ctg	aca	ttc	gca	cag	gcc	ggc	atc	aac	1008	

16/24

Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn
 325 330 335

ccc gtg gtg tgt ttc ctc ttc aac cgg gag ctg agg gac tgt ttc aga 1056
 Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg
 340 345 350

gcc cag ttc ccc tgt tgc cag agc ccc cag gcc acg cag gcc acc ctc 1104
 Ala Gln Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Gln Ala Thr Gln Ala Thr Leu
 355 360 365

ccc tgc gac ctg aaa ggc att ggt ttg tga 1134
 Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu
 370 375

<210> 22
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 22
 Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Leu Arg Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val
 20 25 30

Ser Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg
 35 40 45

Ser Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala
 50 55 60

Asp Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys
 85 90 95

Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe
 100 105 110

Leu Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His
 115 120 125

Arg Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu
 130 135 140

Val Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val
 145 150 155 160

Leu Asp Gly Gly Gly Ala Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu
 165 170 175

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu

17/24

180	185	190
Ala Ala Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe 195 200 205		
Phe Ile His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala 210 215 220		
Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala 225 230 235 240		
Ala Ala Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala 245 250 255		
Leu Val Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu 260 265 270		
Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe 275 280 285		
Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val 290 295 300		
Ala Ser Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala 305 310 315 320		
Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn 325 330 335		
Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg 340 345 350		
Ala Gln Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Gln Ala Thr Gln Ala Thr Leu 355 360 365		
Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu 370 375		

<210> 23
 <211> 1113
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1110)
 <223> Rat SREB2

<400> 23	
atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg	48
Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser	
1 5 10 15	
cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga	96
Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly	

18/24

20	25	30	
gtc agt gtg gtg ggc aac ctt ctg atc tcc att ttg cta gtg aaa gat Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp 35 40 45			144
aag acc ttg cat aga gct cct tac tac ttc ctg ctg gat ctg tgc tgc Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys 50 55 60			192
tca gac atc ctc aga tct gca att tgt ttt cca ttt gta ttc aac tct Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser 65 70 75 80			240
gtc aaa aat ggc tct acc tgg act tac ggg act ctg act tgc aaa gtg Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val 85 90 95			288
att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gcc ttc atg ctc Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu 100 105 110			336
ttc tgc atc agc gtc acc aga tac tta gcc atc gcc cat cac cgc ttc Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe 115 120 125			384
tat aca aag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ttg gct gtg atc tgc atg Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met 130 135 140			432
gtg tgg act ctg tct gtg gcc atg gca ttt ccc cca gtt tta gat gta Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val 145 150 155 160			480
ggc acc tac tca ttc att agg gag gag gat cag tgt acc ttc caa cac Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His 165 170 175			528
cgc tcc ttc agg gct aac gat tcc cta gga ttt atg ctg ctc ctt gct Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala 180 185 190			576
ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttt Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe 195 200 205			624
gtc cac gat cga agg aaa atg aag cca gtc cag ttt gta gca gca gtg Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val 210 215 220			672
agt cag aac tgg acc ttt cat ggc cct gga gct agt ggc cag gca gct Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala 225 230 235 240			720
gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu 245 250 255 260			768

19/24

245	250	255	
ctg ggc atc agg caa aat gcg aat acc aca ggc aga aga cgg ctc ttg Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu 260 265 270			816
gtt ttg gat gag ttc aaa atg gag aaa aga atc agc aga atg ttc tat Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr 275 280 285			864
ata atg act ttc ctc ttc cta acc ttg tgg ggt ccc tac ctg gtg gcc Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala 290 295 300			912
tgc tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe 305 310 315 320			960
cta aca gcc gct gtc tgg atg agt ttc gcc caa gca gga atc aat ccc Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro 325 330 335			1008
ttt gtc tgc att ttc tcc aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr 340 345 350			1056
acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys 355 360 365			1104
gtt ata tga Val Ile 370			1113

<210> 24
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 24
 Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly
 20 25 30
 Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp
 35 40 45
 Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys
 50 55 60
 Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser
 65 70 75 80

20/24

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val
 85 90 95

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu
 100 105 110

Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe
 115 120 125

Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met
 130 135 140

Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val
 145 150 155 160

Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His
 165 170 175

Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala
 180 185 190

Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe
 195 200 205

Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val
 210 215 220

Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala
 225 230 235 240

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu
 245 250 255

Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu
 260 265 270

Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr
 275 280 285

Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala
 290 295 300

Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe
 305 310 315 320

Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro
 325 330 335

Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr
 340 345 350

Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys
 355 360 365

Val Ile
 370

21/24

<210> 25
 <211> 1122
 <212> DNA
 <213> Rat coronavirus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1119)
 <223> Rat SREB3

<400> 25
 atg gcc aac acc acc gga gag ccc gaa gag gtg agc ggc gca ctg tcc 48
 Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser
 1 5 10 15

ctg cca tca gca tgc gct tat gtg aag ctg gtg ctg ctg gga ctg atc 96
 Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile
 20 25 30

atg tgt gta agc ctg gca ggc aat gcc atc ttg tcc ctg ctg gtg ctc 144
 Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu
 35 40 45

aag gag cgt gcc ctg cac aag gct cct tac tac ttt ctg ctg gac ctg 192
 Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu
 50 55 60

tgc cta gcc gat ggc ata cgc tct gcc atc tgc ttc ccc ttt gta ctg 240
 Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Leu
 65 70 75 80

gct tct gtg cgc cat ggc tcc tgc tgg acc ttc agt gca ctc agc tgt 288
 Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys
 85 90 95

aag att gtg gcc ttt atg gct gtg ctc ttt tgc ttc cat gcg gcc ttc 336
 Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe
 100 105 110

atg ctg ttc tgc atc agc gtc acc cgc tac atg gcc atc gcc cac cac 384
 Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His
 115 120 125

cgc ttc tat gcc aag cgc atg aca ctc tgg aca tgc gca gct gtc atc 432
 Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile
 130 135 140

tgc atg gcc tgg acc ttg tct gtg gcc atg gct ttc cca cct gtc ttt 480
 Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe
 145 150 155 160

gat gtg ggc acc tac aag ttt atc cga gag gag gac cag tgc atc ttt 528
 Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe
 165 170 175

22/24

gag cat cgc tac ttc aaa gca aat gac act ctg ggc ttt atg ctt atg	576
Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met	
180 185 190	
ttg gct gtg ctc atg gca gcc aca cat gct gtc tat ggc aag ctg cta	624
Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu	
195 200 205	
ctc ttc gag tat cgt cac cgc aag atg aag cca gtg cag atg gtg ccc	672
Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro	
210 215 220	
gcc atc agc caa aac tgg aca ttc cat ggc cct ggg gct acc ggc cag	720
Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln	
225 230 235 240	
gct gct gcc aac tgg atc gct ggc ttt ggc cgt ggg ccc atg cca cca	768
Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro	
245 250 255	
act ctg ctg ggt atc cgg cag aat ggg cat gca gct agc cgg cgg cta	816
Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu	
260 265 270	
ctg ggc atg gac gag gtc aag ggt gaa aag cag ctg ggc cga atg ttc	864
Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe	
275 280 285	
tac gcg att aca ctg ctc ttc ctg ctc ctc tgg tca cca tac att gtg	912
Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val	
290 295 300	
gcc tgc tac tgg cga gtg ttt gtg aaa gcc tgc gct gtg ccc cac cgc	960
Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg	
305 310 315 320	
tac ctg gcc act gct gtt tgg atg agc ttc gcc cag gct gct gtc aac	1008
Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn	
325 330 335	
cca atc gtc tgc ttc ctg ctt aac aag gac ctc aag aag tgc ctg agg	1056
Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg	
340 345 350	
act cat gcc cct tgc tgg ggc aca gga ggt gcc cca gct ccc aga gaa	1104
Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu	
355 360 365	
ccc tac tgt gtc atg tga	1122
Pro Tyr Cys Val Met	
370	

<210> 26
<211> 373

23/24

<212> PRT

<213> Rat coronavirus

<400> 26

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile
 20 25 30
 Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu
 35 40 45
 Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu
 50 55 60
 Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Leu
 65 70 75 80
 Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys
 85 90 95
 Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe
 100 105 110
 Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His
 115 120 125
 Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile
 130 135 140
 Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe
 145 150 155 160
 Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe
 165 170 175
 Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met
 180 185 190
 Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu
 195 200 205
 Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro
 210 215 220
 Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro
 245 250 255
 Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu
 260 265 270
 Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

24/24

275	280	285
Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val		
290	295	300
Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg		
305	310	315 320
Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn		
	325	330 335
Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg		
	340	345 350
Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu		
	355	360 365
Pro Tyr Cys Val Met		
370		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12P21/02, C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C12P21/02, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5508384, A (Univ. New York State), 16 April, 1996 (16. 04. 96) (Family: none)	1-8
A	The Journal of Neruoscience Vol. 16 No. 12 (1996) Guoping Feng et al., "Cloning and functional characterization of a novel Dopamine receptor from <i>Drosophila melanogaster</i> " p.3925-3933	1-8
A	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 (1994) Stephen Rees et al., "Cloning and characterisation of the human 5-HT _{2a} serotonin receptor" p.242-246	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 June, 1999 (15. 06. 99)Date of mailing of the international search report
22 June, 1999 (22. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 15/12, C07K 14/705, C12P 21/02, C07K 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5508384, A (Univ. New York State) 16. 4月. 1996 (16. 04. 96) パテントファミリーなし	1-8
A	The Journal of Neuroscience Vol. 16 No. 12 (1996) Guoping Feng et al. "Cloning and functional characterization of a novel Dopamine receptor from <i>Drosophila melanogaster</i> " p. 3925-3933	1-8
A	FEBS Letters Vol. 355 No. 3 (1994) Stephen Rees et al. "Cloning and characterisation of the human 5-HT _{5A} serotonin receptor" p. 242-246	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 06. 99

国際調査報告の発送日

22.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9 3 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448